

УДК 543.544+543.51

DOI: 10.15587/2519-4852.2017.92823

## РАЗРАБОТКА И ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИКИ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ СИЛДЕНАФИЛА И N-ДЕСМЕТИЛ СИЛДЕНАФИЛА С ПОМОЩЬЮ ВЭЖХ-МС/МС В ПЛАЗМЕ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА

© И. Э. Кузнецов, Е. А. Науменко, Н. К. Резниченко, А. Ю. Костюк, Р. П. Савяк, Д. С. Олейников

**Цель.** Для изучения биоэквивалентности таблетированной формы силденафила (таблетки «Тегрум» 100 мг), производства ООО «НПФ «Микрохим» (г. Рубежное, Украина) был разработан и валидирован быстрый, простой и специфический метод количественного определения концентрации силденафила и его активного метаболита - N-десметил силденафила в плазме крови человека с применением внутренних стандартов, меченных атомами дейтерия. Извлечение аналитов из плазмы крови выполнялось методом прямой жидкость-жидкостной экстракции.

**Методы.** Содержание силденафила и его десметилированного метаболита определяли в надосадочной жидкости методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с тандемным масс-спектрометрическим детектированием. Ионизацию силденафила, N-десметил силденафила, силденафила-d8 и N-десметил силденафила-d8 проводили электрораспылением в положительном режиме (ESI, Positive). При детектировании использовали мониторинг мультиреакций (MRM) выбранных материнских ионов с  $m/z$  475,30; 483,20; 461,20; 469,20. Дочерний ион был выбран с  $m/z$  283,10 для всех анализируемых соединений.

**Результаты.** В ходе валидации данного метода в линейном диапазоне 5,05-1009,92 нг/мл для силденафила и 2,24-400,84 нг/мл для N-десметил силденафила коэффициент корреляции ( $r^2$ ) составил 0,9975 и 0,9973 соответственно, также была продемонстрирована надёжная правильность и воспроизводимость результатов для обеих аналитов.

**Выводы.** Разработан и валидирован простой, специфический и чувствительный ВЭЖХ-МС/МС метод количественного определения концентрации силденафила и его активного метаболита N-десметил силденафила в плазме крови человека с применением меченных стабильными изотопами внутренних стандартов - силденафил-d8 и N-десметил силденафил-d8. Разработанный нами экспресс-метод подготовки биологических образцов, позволяет исключить влияние биологической матрицы на получаемые результаты и определять низкие концентрации обоих аналитов в надосадочной жидкости без применения таких трудоемких и времязатратных процедур, как концентрирование пробы, восстановление сухого остатка или дорогостоящей твердофазной экстракции. Экспериментальные данные, полученные в ходе полной валидации метода, соответствуют установленным национальным и международным требованиям, а также подтверждают высокую специфичность, чувствительность, точность, воспроизводимость и экономичность разработанного нами метода

**Ключевые слова:** силденафил, N-десметил силденафил, фармакокинетика, ВЭЖХ-МС/МС, эффект матрицы, дейтерированные стандарты, биоэквивалентность

### 1. Введение

Ранее в биоаналитической лаборатории ООО «КДЦ «Фармбиотест» для изучения фармакокинетики спреевой формы силденафила был разработан метод количественного определения концентрации силденафила в плазме крови человека с помощью тандемной высокоэффективной жидкостной хроматографии и масс-спектрометрическим детектированием (ВЭЖХ-МС/МС) [1]. Особенностью данного метода было использование дейтерированного внутреннего стандарта. Этот метод был успешно валидирован и применен в ходе открытого исследования I фазы орального спрея «Тегрум» производства ООО «НПФ «МИКРОХИМ» (код исследования: SiIS/PhI-PK), выполненного в 2013 г.

Следующим шагом в фармакокинетических исследований этой группы препаратов, к которым была привлечена биоаналитическая лаборатория ООО «КДЦ «Фармбиотест», стала оценка биоэквивалентности таблетированных форм силденафила – таблетки «Тегрум», производства ООО «НПФ «Мик-

рохим» (г. Рубежное, Украина) и таблетки «Виагра», производства Pfizer PGM, Франция, путем сравнительного изучения их биодоступности при однократном приеме натощак здоровыми добровольцами, что позволит представить фармакокинетические данные, подтверждающие терапевтическую эквивалентность воспроизведенного и референтного препаратов.

### 2. Постановка проблемы в общем виде, актуальность темы и ее связь с важными научными или практическими вопросами

Соответственно, возник вопрос разработки методики количественного определения не только силденафила, но и его фармакологически активного метаболита – N-десметил силденафила в плазме крови человека. Поскольку к этому моменту имелась разработанная и валидированная в нашей лаборатории методика количественного определения силденафила, данную методику было необходимо доработать для одновременного определения силденафила и N-десметил силденафила.

### 3. Анализ последних исследований и публикаций, в которых начато решение данной проблемы и на которые опираются авторы

В литературе имеется всего несколько публикаций [2–6], посвященных количественному определению силденафила в биологических жидкостях с использованием ВЭЖХ-МС/МС методов и применением различных видов внутренних стандартов. Так в работах [2, 3] при определении силденафила в качестве внутренних стандартов использовали тадалафил и омепразол соответственно. Детектирование аналита проводилось на ВЭЖХ-МС/МС системе Waters ACQUITY UPLC (Waters Corporation, Milford, Massachusetts), оснащенной Waters-Micromass Quattro Micro tandemным масс-спектрометром и 2795 Alliance HPLC system, оснащенной Micromass ZQ-2000 (Waters, Milford, MA, USA) с источником ионизации ESI и квадрупольным масс-детектором. Для проведения анализа в обоих случаях использовали 500 мкл плазмы. С целью повышения чувствительности методов в этих исследованиях применялась ЖЖЭ органическим растворителем с последующим упариванием экстракта в токе инертного газа и растворением сухого остатка. Объем проб, в которых определяли содержание силденафила, составлял 5 и 25 мкл раствора восстановленного остатка; линейный участок зависимости отклик прибора - концентрация силденафила в плазме находился в интервале 1–1000 нг/мл и 0,5–2000 нг/мл соответственно [2, 3].

В работе Zayed R. с соавт. описана методика количественного определения силденафила в плазме крови с применением tandemной LC-MS/MS системы, включавшей жидкостный хроматограф Shimadzu Prominence (Shimadzu, Япония) и масс-спектрометр API-3200 (MDS Sciex, США), где в качестве внутреннего стандарта использовался торасемид. Извлечение силденафила из 1,0 мл плазмы проводили прямой жидкость-жидкостной экстракцией 1,0 мл ацетонитрила, содержащего торасемид, без дальнейшего концентрирования экстракта. Для количественного анализа 20 мкл надосадочной жидкости направлялось на хромато-масс-спектрометрическую детекцию [4].

### 4. Выделение не решенных ранее частей общей проблемы, которой посвящена статья

Наибольший интерес у нас вызвали работы, в которых использовали метод ВЭЖХ-МС/МС количественного определения силденафила и N-десметил силденафила с применением дейтерированной формы внутренних стандартов, поскольку изотопно-меченные аналоги аналитов зачастую являются лучшими внутренними стандартами ввиду пренебрежимо малых химических различий, обусловленных изотопным замещением, и совпадающей с аналитами способностью к образованию водородных связей с неподвижной фазой, т. е. фактически не оказывающий влияния на результаты выделения и обработки пробы [5, 6]. Такой подход не может быть использован в классической хроматографии с универсальными детекторами, так как определяемое вещество и внутренний стандарт трудно разделить хроматографически. Этот вариант возможен только с масс-селективным детектированием, когда неразделенные

пики детектируются по их характеристическим ионам масс-спектра [5].

В качестве прототипа был использован метод ВЭЖХ-МС/МС определения силденафила и N-десметил силденафила, описанный в работе [6], который был модифицирован сотрудниками биоаналитической лаборатории ООО «КДЦ «Фармбиотест». Модификация состояла в том, что применялся экспресс-метод ЖЖЭ силденафила из плазмы крови с одновременным осаждением белков и последующим анализом 20 мкл надосадочной жидкости с помощью ВЭЖХ-МС/МС системы в составе модульного хроматографа Shimadzu (Shimadzu, Япония) и масс-спектрометра API-3000 (AB Sciex, США), оснащенного тройным квадрупольным масс-детектором. Для количественного определения концентрации силденафила и N-десметил силденафила применялись внутренние стандарты, меченные 8-ю атомами дейтерия – силденафил-d8 и N-десметил силденафил-d8. Химические структуры аналитов и внутренних стандартов представлены на рис. 1. Для проведения анализа использовали 150 мкл плазмы.

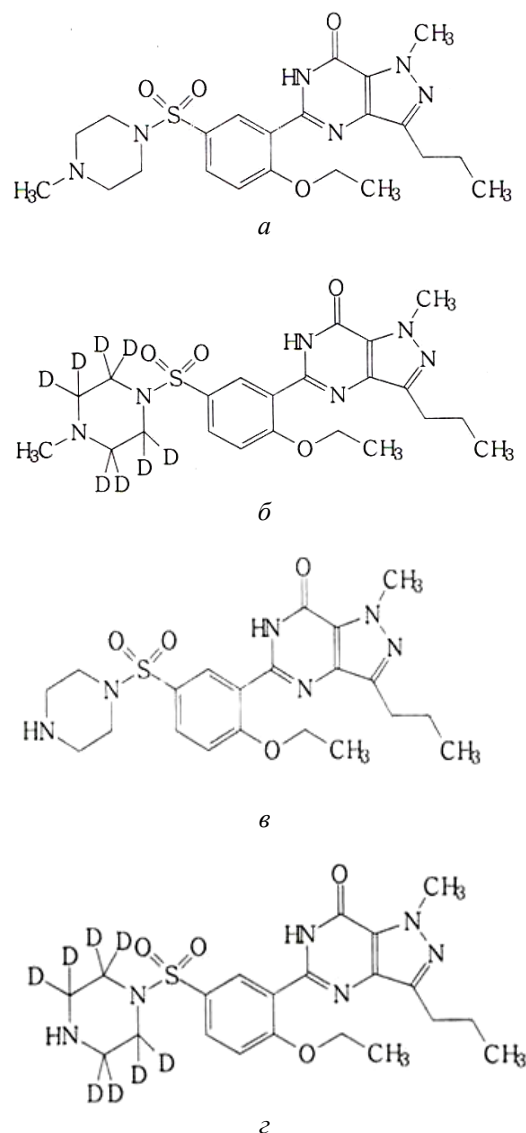


Рис. 1. Химическая структура: а – силденафила; б – силденафила-d8; в – N-десметил силденафила; г – N-десметил силденафила-d8

## 5. Формулирование целей (задач) исследования

Цель исследования состояла в разработке и валидации методики количественного определения силденафила и его метаболита – N-десметил силденафила в плазме крови человека методом ВЭЖХ-МС/МС с использованием в качестве внутреннего стандарта дейтерированных производных силденафила и N-десметил силденафила. Разработка и валидация данной методики была проведена в рамках изучения биоэквивалентности препарата «Тегрум», таблетки по 100 мг производства ООО «НПФ «Микрохим» с участием здоровых добровольцев (код исследования: SILTBE-100) и предшествовала проведению клинического этапа исследования.

## 6. Изложение основного материала исследования (методов и объектов) с обоснованием полученных результатов

Экспериментальная часть количественного определения концентрации силденафила в плазме крови человека методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием

### 6. 1. Реактивы

Стандарты:

1. Силденафила цитрат – фармакопейный стандартный образец ДФУ (рег. № CAS 171599-83-0, каталожный номер ФСО ДФУ S0371; аттестованное содержание силденафила цитрата 98,4%).

2. Силденафил-d8 – силденафил меченный стабильным изотопом водорода – дейтерием (рег. № CAS 951385-68-5; Содержание C<sub>22</sub>H<sub>22</sub>N<sub>6</sub>O<sub>4</sub>SD<sub>8</sub> – 99,00 % (HPLC) и содержание атомов дейтерия в молекуле – 99,30 atom % D (N.M.R.); C/D/N Isotopes, Канада).

3. N-десметил силденафил – коммерческий стандартный образец (TLC Pharmachem, Lot No. 1477-072A2, содержание C<sub>21</sub>H<sub>28</sub>N<sub>6</sub>O<sub>4</sub>S – 99,40 % (HPLC)).

4. N-десметил силденафил-d8 – метаболит силденафила меченный стабильным изотопом водорода – дейтерием (TLC Pharmachem, Lot No. 1180-021A4, содержание C<sub>21</sub>H<sub>20</sub>N<sub>6</sub>O<sub>4</sub>SD<sub>8</sub> – 99,70 % (HPLC) и содержание атомов дейтерия в молекуле – 98,80 % (N.M.R.))

Растворители, реактивы, биологическая матрица:

Ацетонитрил (HPLC grade; «Sigma-Aldrich», Германия); метанол (HPLC grade; «Sigma-Aldrich», Германия); аммония ацетат (for analysis, ≥98,5%; «Sigma-Aldrich», Германия); кислота уксусная (х.ч., Украина).

Вода деионизованная, полученная с использованием установки обратного осмоса («Adrona Crystal B Bio», Латвия); бланковая плазма крови человека (содержащая K<sub>2</sub>EDTA в качестве антикоагулянта).

### 6. 2. Инструментальный анализ

Использовали высокоэффективный жидкостный хроматограф «Shimadzu Prominence» в составе: два насоса – LC-20AD<sub>XR</sub>, автосамплер – SIL-20AC,

термостат – CTO-20, оснащенный масс-селективным детектором API-3000 (AB Sciex, США) с тройным квадрупольным анализатором и системой обработки данных.

Аналитическая колонка – PerfectSil 100 ODS-3, 3 µm 100 × 4.6 mm фирмы MZ-Analysetechnik – Германия, предколонка Zorbax SB-C18, Analytical Guard Column 4,6 x 12,5 mm фирмы Agilent Technologies – США. Подвижная фаза содержала 90 % элюента А (ацетонитрил) и 10 % элюента В (10 mM раствор аммония ацетата в воде, pH=5,45±0,05). Элюирование проводилось в изократическом режиме при скорости потока подвижной фазы 0,4 мл/мин. Объем вводимой пробы – 20 мкл. Температура разделения компонентов 45 °С. Продолжительность хроматографирования – 5,5 минуты. Время удерживания силденафила – 4,46 мин.; силденафила-d8 – 4,46 мин.; N-десметил силденафила – 4,29 мин. и N-десметил силденафила-d8 – 4,35 мин.

При детектировании использовали мониторинг выбранных материнских и дочерних ионов в следующих настройках масс-спектрометра:

– первый квадруполь был настроен на пропускание материнского (молекулярного) иона с фиксированным значением m/z для силденафила, силденафила-d8, N-десметил силденафила и N-десметил силденафила-d8;

– второй квадруполь был заполнен инертным газом (азотом), в котором происходила ударная диссоциация материнских ионов, в результате чего образовывались дочерние ионы;

– третий квадруполь фильтровал образованные дочерние ионы с фиксированным значением для силденафила, силденафила-d8, N-десметил силденафила и N-десметил силденафила-d8.

Выбранные дочерний и материнский ионы для аналитов и внутренних стандартов обусловлены их максимальной интенсивностью на соответствующих квадрупольных масс-спектрометра при исследовании раствора, содержащего стандартные образцы силденафила, силденафила-d8, N-десметил силденафила и N-десметил силденафила-d8. Таким образом, как показано на рис. 2, были выбраны дочерние ионы с соотношением m/z для силденафила – 475,200 Да; для силденафила-d8 – 483,300 Да; для N-десметил силденафила – 461,300 Да и для N-десметил силденафила-d8 – 469,300 Да. Для всех аналитов и внутренних стандартов был выбран один общий дочерний ион – 283,100 Да.

Масс-селективный детектор фиксировал количество прошедших дочерних ионов в режиме мониторинга мультиреакций (MRM). Параметры работы детектора подбирались для достижения максимального сигнала в режиме MRM. Масс-спектрометрию проводили в режиме положительной ионизации электроспрея (ESI) при напряжении 5500 В. Скорость потока газа-распылителя (азота): 4 л/мин., температура интерфейса – 250 °С.

Для контроля оборудования и обработки хроматографических данных использовалось программное обеспечение Analyst 1.5.2 (AB Sciex, США).

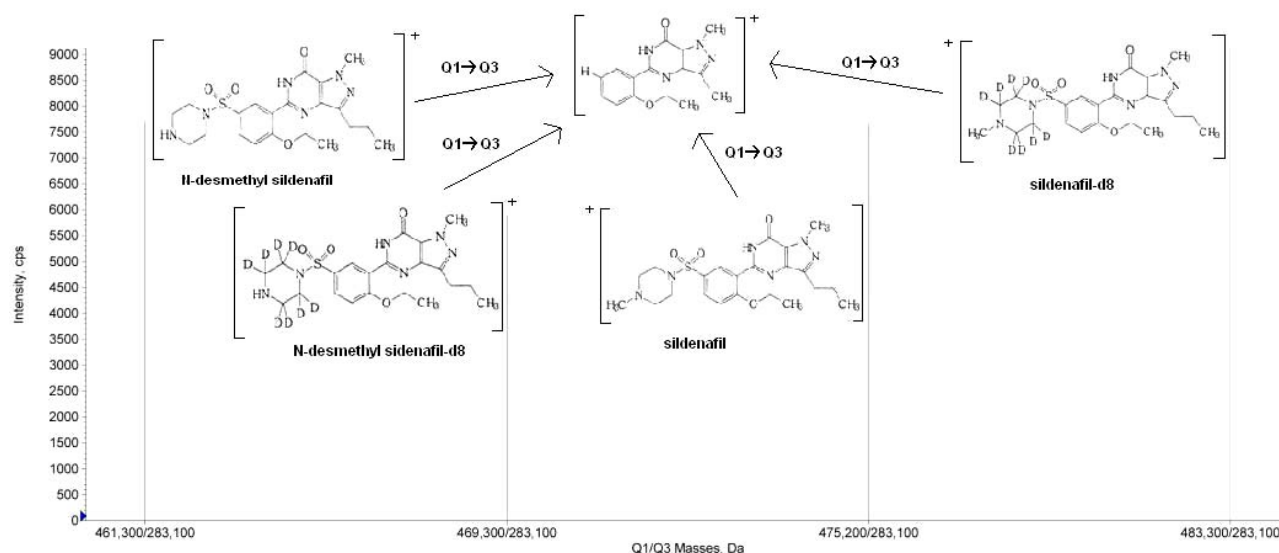


Рис. 2. Спектральный переход Q1/Q3 для силденафила, силденафила-d8, N-десметил силденафила и N-десметил силденафила-d8

### 6.3. Приготовление основных и рабочих стандартных растворов

В качестве основных стандартных растворов использовали раствор силденафила цитрата в метаноле с концентрацией силденафила 0,100167 мг/мл и раствор N-десметил силденафила в метаноле с концентрацией 0,112123 мг/мл. Из раствора силденафила методом независимых разбавлений готовили рабочие стандартные растворы силденафила в метаноле с концентрациями 50,50; 252,50; 757,40; 1767,40; 3029,80; 5049,60; 7220,90 и 10099,20 нг/мл.

Из раствора N-десметил силденафила методом независимых разбавлений готовили рабочие стандартные растворы N-десметил силденафила в метаноле с концентрациями 22,40; 100,99; 302,70; 700,80; 1205,30; 1990,20; 2887,20 и 4008,40 нг/мл. Полученные рабочие стандартные растворы применяли для приготовления калибровочных стандартов на плазме. Аналогичным образом готовили рабочие стандартные растворы образцов контроля качества: силденафила в метаноле с концентрациями 152,10; 1009,90; 2001,40; 3029,80; 4002,80 и 8005,60 нг/мл и N-десметил силденафила в метаноле с концентрациями 58,30; 224,30; 403,60; 807,30; 1597,80 и 3206,70 нг/мл, которые использовали для приготовления образцов контроля качества (QC-образцов) на плазме.

Основной стандартный раствор силденафила-d8 в метаноле с концентрацией 0,077000 мг/мл разбавляли для получения рабочего стандартного раствора силденафила-d8 в метаноле с концентрацией 1600 нг/мл, а основной стандартный раствор N-десметил силденафила-d8 в метаноле с концентрацией 0,058000 мг/мл разбавляли для получения рабочего стандартного раствора силденафила-d8 в метаноле с концентрацией 650 нг/мл.

Приготовленные основные и рабочие стандартные растворы силденафила, N-десметил силденафила, силденафила-d8 и N-десметил силденафила-d8 хранили в холодильной камере при температуре от +2 °C до +8 °C. Стабильность стандартных растворов была верифицирована в процессе валидации методики.

### 6.4. Приготовление калибровочных стандартов и QC-образцов на плазме

Калибровочные стандарты и QC-образцы готовили на бланковой плазме из рабочих стандартных растворов: для силденафила с концентрациями 50,50; 252,50; 757,40; 1767,40; 3029,80; 5049,60; 7220,90; 10099,20 нг/мл и 152,10; 1009,90; 2001,40; 3029,80; 4002,80; 8005,60 нг/мл и для N-десметил силденафила с концентрациями 22,40; 100,99; 302,70; 700,80; 1205,30; 1990,20; 2887,20; 4008,40 нг/мл и 58,30; 224,30; 403,60; 807,30; 1597,80; 3206,70 нг/мл соответственно. В ячейки глубоколоночного микропланшета (1,1 мл) вносили по 120 мкл бланковой плазмы, к которой прибавляли аликвоты 15 мкл соответствующего рабочего стандартного раствора силденафила и N-десметил силденафила. После заполнения лунок микропланшет на 1 мин. помещали на встряхиватель для перемешивания содержимого ячеек. Конечная концентрация в калибровочных стандартах и QC-образцах для силденафила на плазме составляла: 5,05; 25,25; 75,74; 176,74; 302,98; 504,96; 722,09; 1009,92 нг/мл и 15,21; 100,99; 200,14; 302,98; 400,28; 800,56 нг/мл соответственно. Концентрация в калибровочных стандартах и QC-образцах для N-десметил силденафила на плазме составляла: 2,24; 10,09; 30,27; 70,08; 120,53; 199,02; 288,72; 400,84 нг/мл и 5,83; 22,43; 40,36; 80,73; 159,78; 320,67 нг/мл соответственно. Далее проводили процедуру экстракции силденафила и N-десметил силденафила из плазмы, начиная с прибавления по 15 мкл рабочих стандартных растворов внутренних стандартов силденафила-d8 и N-десметил силденафила-d8 (см. ниже).

### 6.5. Приготовление биообразцов для анализа

В ячейку глубоколоночного микропланшета (1,1 мл) помещали аликвоту 150 мкл плазмы крови, прибавляли по 15 мкл рабочих растворов внутренних стандартов и перемешивали содержимое на встряхивателе в течение 1 мин. К полученному раствору плазмы прибавляли 570 мкл преципитирующего раствора (ацетонитрил) и содержимое вновь перемешивали.

вали на встряхивателе в течение 1 мин. Глубоколуночный микропланшет с подготовленными биообразцами помещали в предварительно охлажденную до 10 °С центрифугу (Eppendorf 5804 R) и центрифугировали при 3700 об./мин. (2250G) и температуре +10 °С в течение 15 мин. После центрифугирования глубоколуночный микропланшет с экстрагированными образцами передавали на этап хроматографирования. Полученный раствор вводили в петлю прибора в объеме 20 мкл. Определение концентрации силденафила и N-десметил силденафила проводили методом тандемной ВЭЖХ-масс-спектрометрии (см. раздел 6.2). Каждый биообразец при проведении фармакокинетических исследований анализировался однократно.

### 7. Результаты исследования и их обсуждение

Как было указано выше, количественный анализ проводили методом внутреннего стандарта. Линейность калибровочной кривой оценивали методом взвешенной линейной регрессии наименьших квадратов, с весовой функцией  $1/x^2$ , в системе координат «отношение площадей хроматографических пиков силденафил/силденафил-d8 – концентрация» и «отношение площадей хроматографических пиков N-десметил силденафил/N-десметил силденафил-d8 – концентрация». Линейная зависимость находилась в интервале концентраций 5,05–1009,92 нг/мл силденафила и 2,24–400,84 нг/мл N-десметил силденафила в плазме крови человека. График описывался линейным уравнением

$$y=a \times x+b,$$

где  $y$  – отношение площадей пиков аналита и внутреннего стандарта;  $a$  – свободный член линейной зависимости,  $b$  – угловой коэффициент линейной зависимости,  $x$  – концентрация силденафила в плазме, нг/мл.

Средний коэффициент корреляции ( $r^2$ ) составил 0,9975 для силденафила и 0,9973 для N-десметил силденафила, что соответствует удовлетворительной аппроксимации [7].

Валидация метода была выполнена с соблюдением требований руководящих документов OECD/WHO по Надлежащей Лабораторной Практике [8], а также Руководств по валидации биоаналитических методик FDA [9], EMA [10] и Министерства здравоохранения Украины [11, 12].

**Селективность.** Для определения селективности было протестировано 6 образцов бланковой плазмы крови (с  $K_2EDTA$ ) на возможность создания помех сопутствующими веществами (антикоагулянты, эндогенные компоненты матрицы, неактивные метаболиты, продукты разложения и т. д.). Проведён анализ плазмы крови (с  $K_2EDTA$ ), не содержащей аналиты и внутренние стандарты (рис. 3, а) и образцов плазмы с добавлением рабочих стандартных растворов силденафила, N-десметил силденафила, силденафила-d8 и N-десметил силденафила-d8 (рис. 3, б). На хроматограммах образцов бланковой плазмы не наблюдалось пиков со временем удерживания, соответствующим времени удерживания силденафила и силденафила-d8.

**Эффект матрицы.** Эффект матрицы – это прямое или косвенное изменение (интерференция) в отклике прибора из-за присутствия других аналитов или веществ в образце. Целью валидации параметра «Эффект матрицы» является определение влияния биологической матрицы (плазмы крови) на эффективность ионизации аналита и внутреннего стандарта. Было исследовано шесть партий бланковой плазмы с  $K_2EDTA$ , полученной от шести разных доноров.

Влияние биологической матрицы на эффективность ионизации аналитов и внутренних стандартов определялось путем вычисления отношения площади пика компонента в образце биологической матрицы, к площади пика соответствующего компонента в чистом растворителе. Нормализованный по внутреннему стандарту эффект матрицы ( $MF_N$ ) определялся для образцов QCL и QCH, как отношение матричного эффекта аналита к матричному эффекту внутреннего стандарта. Результаты вычислений нормализованного по внутреннему стандарту эффекта матрицы представлены в табл. 1. Согласно Руководств [9–12], коэффициент вариации матричного фактора, нормализованного по внутреннему стандарту ( $MF_N$ ) для 6 партий плазмы, не должен превышать 15,00 %. Как видно из табл. 1, наибольший коэффициент вариации  $MF_N$  оказался в 3 раза ниже допустимого значения, т. е. полученные результаты соответствуют установленным критериям, что свидетельствует об отсутствии заметного влияния эндогенных компонентов плазмы крови на эффективность ионизации силденафила и, соответственно, на конечный результат его количественного определения.

Таблица 1

Эффект матрицы, нормализованный по внутреннему стандарту

Партия бланковой плазмы	Эффект матрицы, нормализованный по внутреннему стандарту, $MF_N$			
	Силденафил		N-десметил силденафил	
	Q1 (15,21 нг/мл)	Q4 (800,56 нг/мл)	Q1 (5,83 нг/мл)	Q4 (320,67 нг/мл)
1	1,19	1,07	1,14	1,01
2	1,17	1,12	1,11	1,12
3	1,17	1,09	1,15	1,15
4	1,17	1,14	1,13	1,12
5	1,22	1,11	1,12	1,10
6	1,11	1,07	1,13	1,09
$MF_N$ ср., (n=6)	1,17	1,10	1,13	1,10
CV, %, (n=6)	2,56	2,73	0,88	4,55



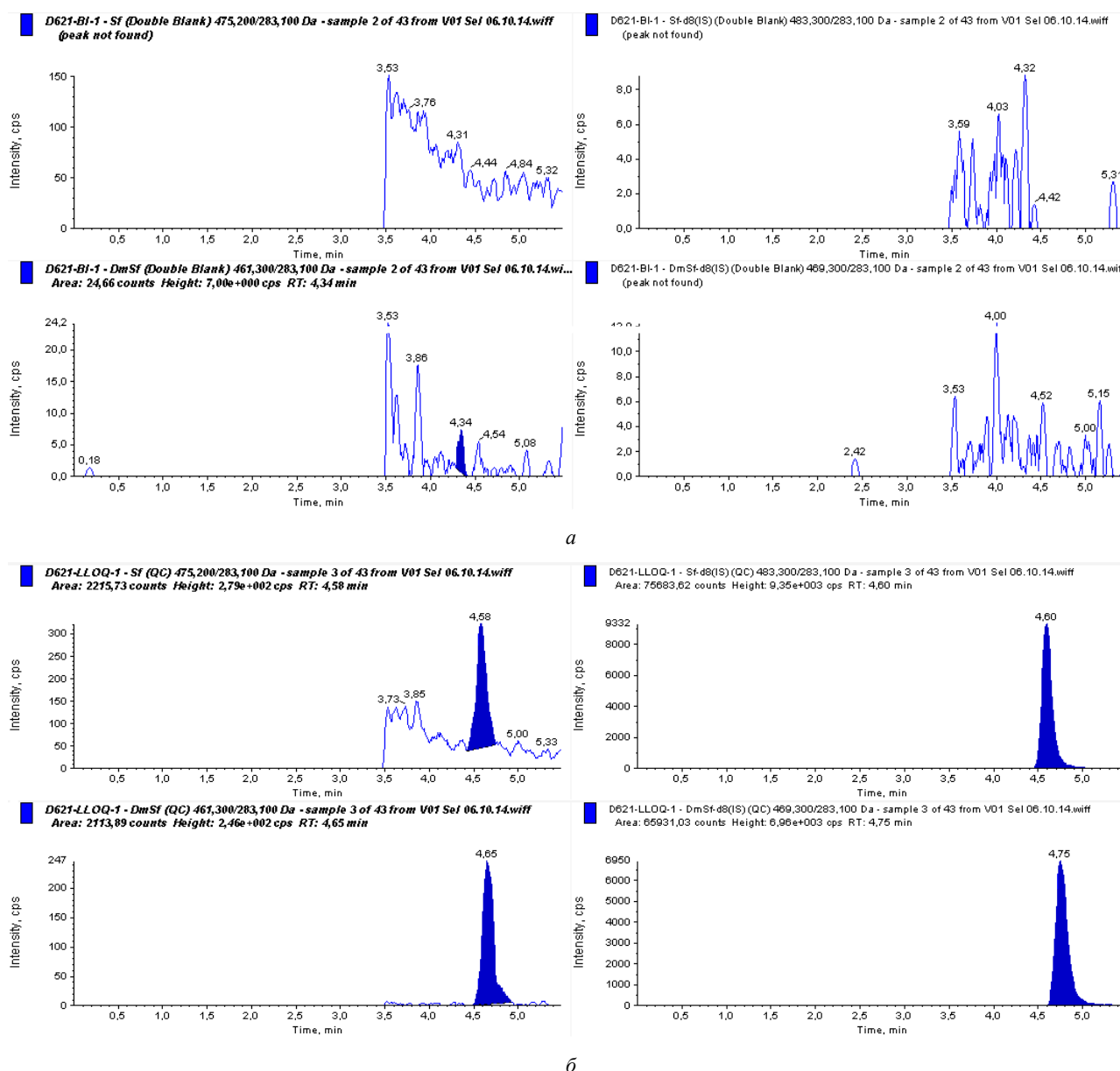


Рис. 3. Типичная хроматограмма плазмы крови, отобранной в вакуумные пробирки с антикоагулянтом  $K_2EDTA$ : фрагмент *a* – не содержащей силденафил (Sf), силденафил-d8 (Sf-d8), N-десметил силденафил (DmSf) и N-десметил силденафил-d8 (DmSf-d8); фрагмент *б* – содержащей силденафил в концентрации 5,05 нг/мл (левый верхний угол), силденафил-d8 в концентрации 160,00 нг/мл (правый верхний угол), N-десметил силденафил в концентрации 2,24 нг/мл (левый нижний угол) и N-десметил силденафил-d8 в концентрации 65,00 нг/мл (правый нижний угол)

**Линейность.** Линейность калибровочной кривой оценивали по калибровочным стандартам силденафила и N-десметил силденафила, приготовленных на плазме крови, используя алгоритм вычисления параметров взвешенной линейной регрессии методом наименьших квадратов в системе координат «отношение площадей хроматографических пиков аналит/внутренний стандарт – концентрация». Калибровочные кривые представлены на рис. 4.

Доказана линейная зависимость между отношением концентраций и площадей хроматографических пиков силденафила и силденафила-d8 в интервале от 5,05 нг/мл до 1009,92 нг/мл и N-десметил силденафила и N-десметил силденафила-d8 в интервале от 2,24 нг/мл до 400,84 нг/мл. Коэффициенты корреляции составили в среднем  $r^2$  0,9975 и 0,9973 соответственно.

**Нижний предел количественного определения.** Нижний предел количественного определения –

наименьшая концентрация анализируемого вещества, которая может быть обнаружена данным аналитическим методом с необходимой правильностью и прецизионностью. Масс-спектрометрический детектор, оснащенный тройным квадрупольным анализатором, позволяет достичь необходимого нижнего предела количественного определения силденафила и N-десметил силденафила с хорошей воспроизводимостью результатов. Нижний предел количественного определения оценивали по результатам анализа 5 проб, содержащих силденафил и N-десметил силденафил, которые были приготовлены на плазме. Валидируемый нижний предел количественного определения составил 5,05 нг/мл для силденафила и 2,24 нг/мл для N-десметил силденафила. Результаты пятикратного определения концентрации силденафила и N-десметил силденафила в образцах «НПКО» представлены в табл. 2, 3.

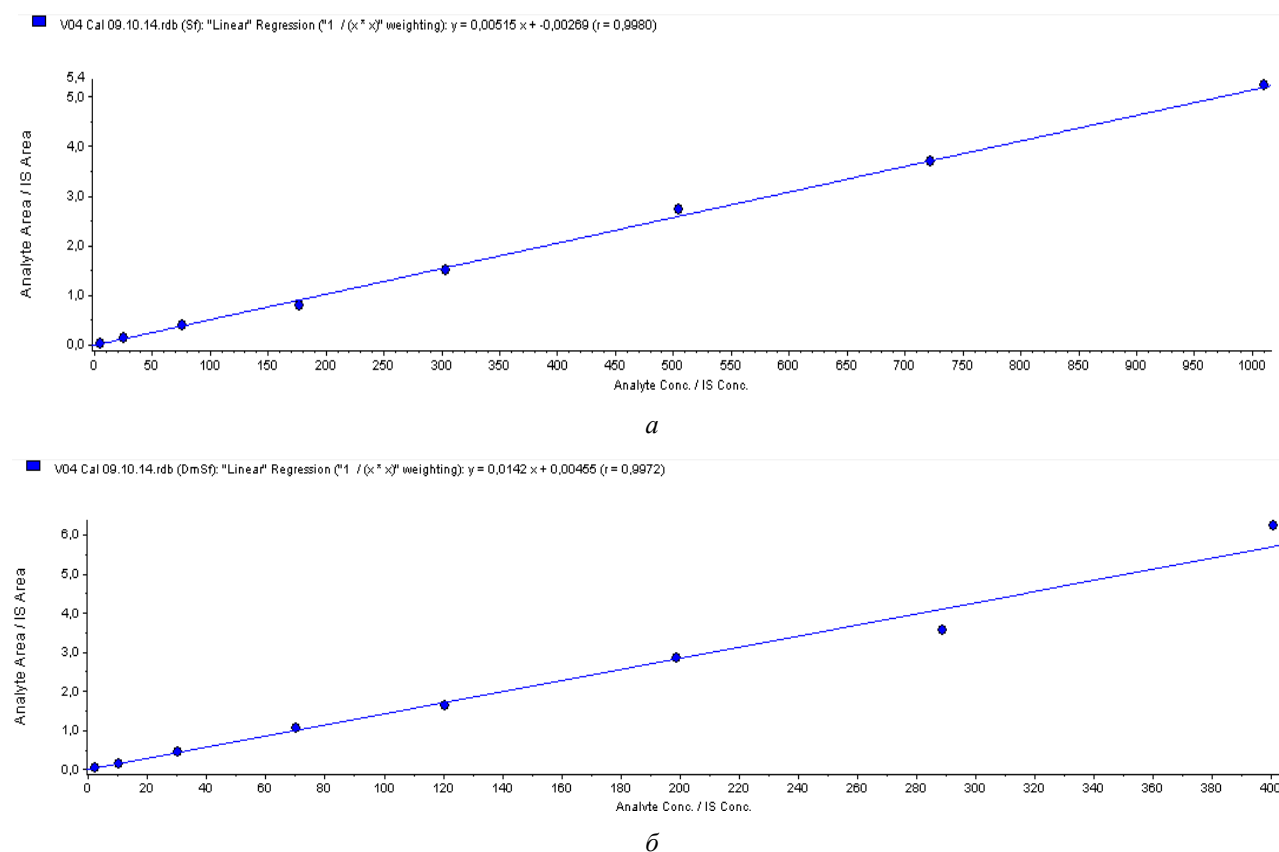
Рис. 4. Калибровочная кривая в плазме крови: *a* – для силденафила; *б* – для N-десметил силденафила

Таблица 2

Результаты пятикратного определения силденафила в образцах «НПКО»

Номер образца «НПКО»	Номинальная концентрация, нг/мл	Площадь аналита	Площадь внутреннего стандарта	Отношение, $y$	Найденная концентрация, нг/мл
1	5,05	2336,23	75264,29	0,03104	6,55
2	5,05	1820,44	72171,36	0,02522	5,42
3	5,05	2068,80	83212,36	0,02486	5,35
4	5,05	2896,98	93401,49	0,03102	6,55
5	5,05	2159,40	82575,83	0,02615	5,60
Среднее	—	2256,37	81325,07	0,02766	5,89
SD	—	—	—	—	0,60
n	—	—	—	—	5
CV, %	—	—	—	—	10,25
RE, %	—	—	—	—	116,63

Таблица 3

Результаты пятикратного определения N-десметил силденафила в образцах «НПКО»

Номер образца «НПКО»	Номинальная концентрация, нг/мл	Площадь аналита	Площадь внутреннего стандарта	Отношение, $y$	Найденная концентрация, нг/мл
1	2,24	1990,20	60412,41	0,03294	2,00
2	2,24	1927,77	50682,28	0,03804	2,35
3	2,24	2289,38	62103,39	0,03686	2,27
4	2,24	2538,21	71059,67	0,03572	2,19
5	2,24	2318,61	63923,33	0,03627	2,23
Среднее	—	2212,83	61636,22	0,03597	2,21
SD	—	—	—	—	0,13
n	—	—	—	—	5
CV, %	—	—	—	—	6,04
RE, %	—	—	—	—	98,66

**Правильность и прецизионность.** Правильность и прецизионность методики оценивали в ходе анализа одной серии и между 3 сериями для

каждого из семи концентрационных уровней QC-образцов после анализа 5 растворов каждого уровня.

Правильность ( $RE$ , %) рассчитывалась, как процент отклонения найденной концентрации от номинального значения по формуле:

$$RE = \frac{C_{back} \times 100}{C_{ном}},$$

где  $RE$  – правильность, %;  $C_{back}$  – среднее арифметическое значение найденных концентраций силденафила и N-десметил силденафила в QC-образцах, нг/мл;  $C_{ном}$  – номинальная концентрация силденафила и N-десметил силденафила в QC-образцах, нг/мл.

Прецизионность выражалась в виде коэффициента вариации ( $CV$ , %) для каждой серии образцов согласно формулы:

$$CV = \frac{SD \times 100}{C_{ср}},$$

где  $CV$  – прецизионность определения, %;  $SD$  – стандартное отклонение среднего результата, нг/мл;  $C_{ср}$  – среднее арифметическое значение найденных концентраций, нг/мл. Полученные данные межсерийной правильности и прецизионности представлены в табл. 4, 5.

Таблица 4

Межсерийная правильность и прецизионность методики количественного определения силденафила в плазме крови

Конц. уровень	«НПКО»	Q1	Q1.1	Q2	Q2.1	Q3	Q4
Номинальная конц., нг/мл	5,05	15,21	100,99	200,14	302,98	400,28	800,56
Стандарт 1-1	5,86	16,81	108,38	203,43	270,34	411,52	813,11
Стандарт 2-1	5,36	17,20	104,35	195,89	278,87	426,44	775,04
Стандарт 3-1	5,32	17,11	112,67	209,44	272,21	411,93	791,13
Стандарт 4-1	5,13	16,93	105,99	201,5	271,51	409,68	800,98
Стандарт 5-1	5,21	16,26	107,02	198,75	265,08	422,49	773,21
Стандарт 1-2	5,19	15,70	92,73	190,93	297,13	370,92	831,52
Стандарт 2-2	5,48	15,97	92,86	187,33	300,55	370,83	846,50
Стандарт 3-2	5,35	17,12	96,08	188,21	301,82	381,85	822,58
Стандарт 4-2	5,85	16,66	94,97	186,08	296,62	378,63	825,11
Стандарт 5-2	5,29	16,92	97,18	188,53	301,14	393,38	795,41
Стандарт 1-3	4,91	18,73	95,31	185,49	271,91	381,93	767,75
Стандарт 2-3	4,18	13,15	99,93	196,29	269,75	395,72	793,07
Стандарт 3-3	4,18	14,82	92,96	204,53	271,91	393,05	821,56
Стандарт 4-3	5,46	15,96	96,52	207,18	260,99	375,13	795,97
Стандарт 5-3	4,46	14,79	96,89	210,43	268,63	390,19	754,82
Среднее значение	5,15	16,28	99,59	196,93	279,90	394,25	800,52
SD	0,52	1,31	6,43	8,84	14,86	18,34	26,07
CV, %	10,06	8,08	6,45	4,49	5,31	4,65	3,26
RE, %	101,95	107,00	98,61	98,40	92,38	98,49	99,99

Таблица 5

Межсерийная правильность и прецизионность методики количественного определения N-десметил силденафила в плазме крови

Конц. уровень	«НПКО»	Q1	Q1.1	Q2	Q2.1	Q3	Q4
Номинальная конц., нг/мл	2,24	5,83	22,43	40,36	80,73	159,78	320,67
Стандарт 1-1	2,58	6,35	20,94	41,38	79,32	171,04	312,21
Стандарт 2-1	2,09	6,25	20,84	42,88	80,03	175,12	310,71
Стандарт 3-1	2,35	5,65	21,37	40,83	79,59	172,18	315,52
Стандарт 4-1	2,18	5,9	20,21	42,53	77,84	173,40	323,02
Стандарт 5-1	2,21	6,09	21,42	43,68	82,64	173,12	304,64
Стандарт 1-2	2,54	6,12	19,84	39,29	87,98	168,26	344,61
Стандарт 2-2	2,37	5,49	20,64	38,86	89,84	160,62	334,47
Стандарт 3-2	2,66	5,74	20,12	36,24	87,70	161,52	320,28
Стандарт 4-2	2,59	6,15	20,48	39,81	91,29	165,81	320,30
Стандарт 5-2	2,55	5,43	19,89	38,67	90,06	164,86	318,49
Стандарт 1-3	2,43	4,84	20,99	39,92	75,74	154,96	313,90
Стандарт 2-3	2,87	5,10	22,87	41,86	78,35	163,83	317,21
Стандарт 3-3	2,59	5,98	22,84	45,74	84,39	175,05	324,41
Стандарт 4-3	2,25	5,26	23,33	42,66	85,22	175,77	333,75
Стандарт 5-3	2,62	5,58	22,26	43,35	80,97	177,19	329,32
Среднее значение	2,46	5,73	21,20	41,18	83,40	168,85	321,52
SD	0,21	0,45	1,13	2,43	5,04	6,63	10,47
CV, %	8,69	7,79	5,35	5,89	6,05	3,93	3,26
RE, %	109,76	98,26	94,53	102,03	103,30	105,68	100,27



Как видно из табл. 4, 5, для образцов «НПКО» средняя концентрация находилась в пределах 20 % от номинального значения, для образцов QC – 15 % от номинальных значений. Прецизионность, оцениваемая по показателю коэффициента вариации (CV), для образцов «НПКО» не превышала 20 %, для образцов QC – 15 %, что свидетельствует о соответствии правильности и прецизионности метода требованиям регуляторных документов [9–12].

**Степень извлечения.** Степень извлечения силденафила и N-десметил силденафила из плазмы

крови человека определялась сравнением площадей пиков проб, экстрагированных из образцов, с площадями пиков неэкстрагированных образцов, принимаемых за 100 %. Для анализа использовались по 5 QC-образцов концентрационных уровней Q1 и Q4. Средняя степень извлечения из плазмы крови человека составила для силденафила – 94,37 %, для N-десметил силденафила – 96,11 %. Результаты определения степени извлечения силденафила и N-десметил силденафила из плазмы крови представлены в табл. 6.

Таблица 6

Результаты определения степени извлечения силденафила и N-десметил силденафила из плазмы крови

Показатели	Уровни концентраций, в пределах диапазона калибровочной кривой			
	Силденафил		N-десметил силденафил	
	Q1 (15,21 нг/мл)	Q4 (800,56 нг/мл)	Q1 (5,83 нг/мл)	Q4 (320,67 нг/мл)
Recovery, %	88,53	100,21	90,48	101,74
Среднее, нг/мл	94,37		96,11	
SD, нг/мл	8,25		7,96	
CV, %	8,75		8,28	

**Стабильность.** Были изучены следующие виды стабильности: пост-препаративная стабильность (стабильность в автосамплере), стабильность при замораживании-оттаивании, краткосрочная стабильность, долгосрочная температурная стабильность, стабильность основных и рабочих стандартных растворов силденафила и N-десметил силденафила. Изучение стабильности проводилось на модельных биообразцах с концентрациями Q1 и Q4.

Пост-препаративная стабильность изучалась на Q1 и Q4 образцах, которые прошли этап экстракции и затем хранились в автосамплере хроматографа в течение 72 ч при температуре +10 °C. Стабильность при замораживании-оттаивании была проверена после проведения трёх циклов: замораживание при температуре не выше минус 80 °C в течение не менее 12 часов, оттаивание – при комнатной температуре в течение не менее 3 часов. Кратковременная стабильность была изучена при выдерживании образцов в течение 24 часов при комнатной температуре, после чего образцы проходили этап экстракции и анализировались. Долговременную стабильность проверяли

после хранения модельных биообразцов в течение 128 суток при температуре не выше минус 80 °C.

Количественное определение концентрации силденафила и N-десметил силденафила в хранившихся биообразцах проводили по свежеприготовленным калибровочным стандартам. Стабильность оценивалась, как отношение установленной концентрации хранившихся QC-образцов к установленной концентрации свежеприготовленных QC-образцов.

Результаты определения стабильности силденафила в модельных Q1 и Q4 образцах представлены в табл. 7. Как видно из табл. 7, для образцов Q1 и Q4 средняя концентрация хранившихся QC-образцов находилась в пределах (85,00–115,00) % от средней концентрации свежеприготовленных образцов, что соответствует критериям приемлемости, приведенным в регуляторных документах [9–12].

Стабильность основных стандартных растворов силденафила, N-десметил силденафила, силденафила-d8 и N-десметил силденафила-d8 была изучена при хранении в течение 80 суток при температуре от +2 °C до +8 °C. Результаты представлены в табл. 8.

Таблица 7

Стабильность силденафила и N-десметил силденафила в модельных Q1 и Q4 образцах на плазме

Виды стабильности	Стабильность силденафила в образцах			
	Силденафил		N-десметил силденафил	
	Q1 (15,21 нг/мл)	Q4 (800,56 нг/мл)	Q1 (5,83 нг/мл)	Q4 (320,67 нг/мл)
Стабильность в автосамплере, (72 часа, –10 °C)	101,96	105,44	97,52	106,40
Стабильность в процессе замораживания/ оттаивания, (3 цикла)	93,06	113,43	97,85	109,91
Краткосрочная стабильность, (24 часа, +21,3 °C)	97,69	92,90	99,31	90,38
Долгосрочная стабильность, (128 дней, –80 °C)	100,61	101,98	89,11	98,15

Таблица 8

Стабильность основных стандартных растворов силденафила, N-десметил силденафила, силденафила-d8 и N-десметил силденафила-d8

Стандартный раствор	Концентрация компонента в растворе	Стабильность 80 суток от +2 °C до +8 °C
Основной раствор силденафила	0,100167 мг/мл	98,75 %
Основной раствор N-десметил силденафила	0,112123 мг/мл	98,52 %
Основной раствор силденафила-d8	0,077000 мг/мл	96,04 %
Основной раствор N-десметил силденафила-d8	0,058000 мг/мл	98,67 %

Полученные результаты по стабильности анализов и внутренних стандартов в основных стандартных растворах соответствуют установленным в БАЛ ООО «КДЦ «ФАРМБИОТЕСТ» критериям приемлемости (90,00–110,00) %.

## 8. Выводы

Сотрудниками биоаналитической лаборатории ООО «КДЦ «ФАРМБИОТЕСТ» был разработан и валидирован простой, специфический и чувствительный ВЭЖХ-МС/МС метод количественного определения концентрации силденафила и его активного метаболита N-десметил силденафила в плазме крови человека с применением меченных стабильными изотопами внутренних стандартов – силденафила-d8 и N-десметил силденафила-d8. Использование дейтерированных внутренних стандартов позволяет снизить степень погрешности количественного определения за счет практически полного совпадения свойств целевых анализов и внутренних стандартов в процессе экстракции, элюирования и ионизации. Ключевым преимуществом внутренних стандартов, меченных стабильными изотопами, является компенсация эффекта матрицы, поскольку осаждение белков на преаналитическом этапе не позволяет полностью освободиться от матричного эффекта, который зачастую проявляется ионной супрессией, возникающей вследствие сохранения в плазме крови липидов, жирных кислот и других небелковых соединений.

Разработанный экспресс-метод преаналитической подготовки биологических образцов, позво-

ляет нивелировать влияние биологической матрицы на получаемые результаты и определять с необходимой точностью низкие концентрации обоих анализов в надосадочной жидкости без применения таких трудоемких и времязатратных процедур, как концентрирование пробы с последующим восстановлением сухого остатка или дорогостоящей твердофазной экстракции. Характеристики разработанного биоаналитического метода, установленные в процессе его полной валидации, полностью соответствовали утвержденным национальным и международным требованиям, и служат подтверждением высокой специфичности, чувствительности, точности и воспроизводимости разработанного нами метода. Исключение твердофазной экстракции и замена ряда дорогостоящих реагентов позволило снизить себестоимость количественного определения, что было важно, учитывая значительный массив биопроб в запланированном рутинном анализе.

Предложенный нами метод был использован в масштабном (около 2000 определений) рутинном анализе клинических образцов плазмы крови при изучении биоэквивалентности препарата «Тегрум», таблетки по 100 мг производства ООО «НПФ «Микрохим» с участием здоровых добровольцев (код исследования: SiLTBE-100). В процессе выполнения рутинного анализа клинических проб и последующего обязательного повторного анализа клинических образцов, использование данного метода позволило получить стабильные и воспроизводимые результаты, которые полностью соответствовали критериям приемлемости.

## Литература

1. Кузнецов, И. Э. Количественное определение концентрации силденафила в плазме крови человека методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием (LC-MS/MS) [Текст] / И. Э. Кузнецов, Е. А. Науменко, Н. К. Резниченко, А. Ю. Костюк, Р. П. Савяк, Д. С. Олейников // ScienceRise: Pharmaceutical Science. – 2016. – Issue 4 (4). – P. 13–23. doi: 10.15587/2519-4852.2016.87257
2. Marcelín-Jiménez, G. Comparison of Fasting Bioavailability Among 100-mg Commercial, 100-mg Generic, and 50-mg Chewable Generic Sildenafil Tablets in Healthy Male Mexican Volunteers: A Single-Dose, 3-Period, Crossover Study [Text] / G. Marcelín-Jiménez, A. P. Ángeles-Moreno, L. Contreras-Zavala, A. García-González, E. Ramírez-San Juan // Clinical Therapeutics. – 2012. – Vol. 34, Issue 3. – P. 689–698. doi: 10.1016/j.clinthera.2012.01.021
3. Alkharfy, K. V. Simple and sensitive LC-ESI-MS method for the quantitation of sildenafil in plasma samples [Text] / K. V. Alkharfy // Journal of Separation Science. – 2009. – Vol. 32, Issue 22. – P. 3866–3870. doi: 10.1002/jssc.200900469
4. Zayed, R. An in vitro and in vivo comparative study of directly compressed solid dispersions and freeze dried sildenafil citrate sublingual tablets for management of pulmonary arterial hypertension [Text] / R. Zayed, A. O. Kamel, M. Shukr, A. E.-H. El-Shamy // Acta Pharmaceutica. – 2012. – Vol. 62, Issue 3. – P. 411–432. doi: 10.2478/v10007-012-0027-9
5. Johnson, R. D. Identification of Sildenafil (Viagra®) and Its Metabolite (UK-103,320) in Six Aviation Fatalities [Text] / R. D. Johnson, R. J. Lewis // Federal Aviation Administration. – Washington, 2006. – 11 p.
6. Challa, B. R. Sildenafil and N-desmethyl sildenafil quantification in human plasma by HPLC coupled with ESI-MS/MS detection: Application to bioequivalence study [Text] / B. R. Challa, B. Z. Awen, B. R. Chandu, M. Khagga, C. K. Bannoth, K. Kanala et. al. // Analytical Methods. – 2010. – Vol. 2, Issue 8. – P. 1043–1050. doi: 10.1039/c0ay00062k
7. Сычев, К. С. Практическое руководство по жидкостной хроматографии [Текст] / К. С. Сычев. – М.: Техносфера, 2010. – 272 с.
8. Good Laboratory Practice. Oecd principles and guidance for compliance monitoring [Text]. – OECD, 2005.
9. Bioanalytical method validation: Guidance for industry [Text]. – U. S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration. Center for Drug Evaluation and Research (CDER). Center for Veterinary Medicine (CVM), 2001.
10. Guideline on bioanalytical method validation [Text]. – European Medicines Agency (EMA/CHMP/EWP/192217/2009), 2011.
11. СТ-Н МОЗУ 42-7.0:2008. Настанова. Лікарські засоби. Належна Лабораторна Практика [Текст]. – К.: Міністерство охорони здоров'я України, 2009. – 243 с.
12. Жукова, Н. А. Валидация биоаналитического метода [Текст]: метод. рек. / Н. А. Жукова, В. В. Либина, И. В. Кудрис, Н. Н. Падалко. – К., 2013. – 35 с.

Дата надходження рукопису 09.01.2017

**Кузнецов Игорь Эрнестович**, доктор биологических наук, профессор, директор, ООО «КДЦ «ФАРМБИОТЕСТ», ул. Орджоникидзе, 9, г. Рубежное, Украина, 93000  
E-mail: kuznetsov@pharmbiotest.com

**Науменко Елена Алексеевна**, заступитель директора по качеству, ООО «КДЦ «ФАРМБИОТЕСТ», ул. Орджоникидзе, 9, г. Рубежное, Украина, 93000  
E-mail: naumenko@pharmbiotest.com

**Резниченко Наталия Константиновна**, заведующий лабораторией, Биоаналитическая лаборатория, ООО «КДЦ «ФАРМБИОТЕСТ», ул. Орджоникидзе, 9, г. Рубежное, Украина, 93000  
E-mail: reznichenko@pharmbiotest.com.ua

**Костюк Андрей Юрьевич**, ведущий инженер, ООО «КДЦ «ФАРМБИОТЕСТ», ул. Орджоникидзе, 9, г. Рубежное, Украина, 93000  
E-mail: kostyk.andrew@pharmbiotest.com.ua

**Савяк Роман Прокопович**, кандидат химических наук, консультант, ООО «КДЦ «ФАРМБИОТЕСТ», ул. Орджоникидзе, 9, г. Рубежное, Украина, 93000  
E-mail: savjakr-2@yandex.ru

**Олейников Дмитрий Сергеевич**, консультант, ООО «КДЦ «ФАРМБИОТЕСТ», ул. Орджоникидзе, 9, г. Рубежное, Украина, 93000  
E-mail: oleynikovds@yandex.ua

УДК 546.289:541.4:577.115.3:612.12  
DOI: 10.15587/2519-4852.2017.91071

## ДОСЛІДЖЕННЯ ВПЛИВУ КООРДИНАЦІЙНИХ СПОЛУК ГЕРМАНІЮ З НІКОТИНОВОЮ ТА ОКСИЕТИЛИДЕНДИФОСФОНОВОЮ КИСЛОТАМИ НА ЖИРНОКИСЛОТНИЙ СПЕКТР ЛІПІДІВ СИРОВАТКИ КРОВІ

© І. В. Ніженковська, В. П. Нароха, А. В. Бакун, Т. С. Брюзгіна

**Метою роботи** було вивчити вплив координаційних сполук германію з нікотиновою кислотою (МІГУ-1) та германію з нікотиновою та оксietiлидендифосфоновою кислотами (ОЕ-5) на жирнокислотний спектр ліпідів сироватки крові щурів.

**Методи.** Авторами використано метод газохроматографічного аналізу.

**Результати.** Досліджено вплив координаційної сполуки германію з нікотиновою кислотою (МІГУ-1) в дозах 70 мг/кг, 30 мг/кг, 10 мг/кг, координаційної сполуки германію з нікотиновою та оксietiлидендифосфоновою кислотами (ОЕ-5) в дозах 20 мг/кг, 10 мг/кг, 5мг/кг та нікотинової кислоти в дозах 100 мг/кг, 70 мг/кг, 30 мг/кг, 10 мг/кг, на жирнокислотний спектр ліпідів сироватки крові щурів.

**Висновки.** Координаційні сполуки германію з нікотиновою кислотою справляли більш виражений вплив, ніж нікотинова кислота, на співвідношення жирних кислот в сироватці крові тварин збільшуючи вміст ненасичених жирних кислот та знижуючи вміст насичених жирних кислот. Тому перспективним є подальше вивчення запропонованих сполук як потенційних препаратів для профілактики захворювань серцево-судинної системи

**Ключові слова:** германій, нікотинова кислота, жирні кислоти, ліпіди, бісфосфонати, сироватка крові, дозування

### 1. Вступ

Потреба у вирішенні однієї з сучасних проблем медицини – профілактики та лікування захворювань серцево-судинної системи різного генезу вимагає пошуку та вивчення нових сполук, які можуть стати основою для створення ефективних лікарських засобів. Одним з напрямків розвитку досліджень в галузі розробки перспективних препаратів є вивчення комплексів металів з органічними біолігандами, терапевтична ефективність яких доволі часто перевищує таку самого органічного ліганду [1].

### 2. Постановка проблеми у загальному вигляді, актуальність теми та її зв'язок із важливими науковими чи практичними питаннями

Фармакотерапія за участю метаболічних препаратів вважається адаптивною і сприяє перебудові та відновленню біохімічних процесів та спряжених стру-

ктур, тому застосування в клініці препаратів, що містять вітамінні складові з лікувальною метою вважають одним із перспективних напрямків фармакотерапії.

### 3. Аналіз останніх досліджень і публікацій, в яких започатковано розв'язання даної проблеми і на які спирається автор

На вибір ліганду для координації з германієм, з нашої точки зору, може впливати багатофакторність порушень при патологічних процесах. Нікотинова кислота (ніацин) використовується для лікування серцево-судинних захворювань і була першим препаратом, який продемонстрував здатність знижувати розвиток ускладнень та смертність у хворих, які перенесли інфаркт міокарду [2], а відкриття у ХХІ сторіччі окремого ніацин-чутливого рецептору GPR109A відкриває нові межі для розуміння механізму дії даного лікарського засобу. Для підвищення